

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2977241号

(45) 発行日 平成11年(1999)11月15日

(24) 登録日 平成11年(1999)9月10日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 P 21/00

C 1 2 P 21/00

C

// C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 1/20

A

15/09

15/00

A

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:19)

BEST AVAILABLE COPY

請求項の数6(全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平2-202616

(73) 特許権者 999999999

(22) 出願日 平成2年(1990)8月1日

ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト

ドイツ連邦共和国フランクフルト・ア

ム・マイン(番地なし)

(65) 公開番号 特開平3-76595

(72) 発明者 マテイーアス・グローテ

(43) 公開日 平成3年(1991)4月2日

ドイツ連邦共和国デー-3550 マルブル

審査請求日 平成9年(1997)6月19日

ク、グラデンバヘルヴエーク65

(31) 優先権主張番号 P 39 25 550. 6

(74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

(32) 優先日 1989年8月2日

(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

審査官 新見 浩一

(58) 調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)

C12P 21/00 - 21/02

C12N 15/00 - 15/09

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

EPAT (QUESTEL)

(54) 【発明の名称】 大腸菌中での外来性タンパク製造のための最適化発酵法

【57】 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中での外来性タンパクの製法であって、IPTGによる誘導及び炭素源としてグルコースを用いる場合には、酸素分圧が10%より大きいか又はそれに等しくなるようにグルコース濃度をコントロールすることを特徴とする上記の方法

【請求項2】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中での外来性タンパクの製法であって、炭素源及び天然誘導因子としてラクトースが使用される場合には、酸素分圧が10%より大きいか又はそれに等しくなるようにラクトース濃度をコントロールすることを特徴とする上記の方法

【請求項3】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中での外来性タンパクの製法であって、

炭素源及び天然誘導因子としてラクトースが使用され、更に誘導因子としてIPTGが使用される場合には、酸素分圧が10%より大きいか又はそれに等しくなるようにラクトース濃度をコントロールすることを特徴とする上記の方法

【請求項4】 上記の方法の構成要素の少なくとも1つが適用される請求項1、2又は3記載の方法

【請求項5】 上記の方法において、恒相発酵下の発酵、バッチ発酵、恒相発酵とバッチ発酵を交互に繰り返す発酵、及び連続発酵を含む発酵を含むことを特徴とする上記の方法

【請求項6】 上記の方法において、温度を37℃から30℃のような温度まで低下させることを特徴とする上記の方法

【請求項7】 上記の方法において、pHをコントロールすることを特徴とする上記の方法

【請求項8】 上記の方法において、酸素分圧をコントロールすることを特徴とする上記の方法

Reference 2

Japanese Patent No. 2977241

Disclosed is an optimized fermentation method (conditions) for producing foreign proteins, specifically lipocortine-related proteins in E. coli under the control of an inducible lac-promoter. The inventor found a novel method in which volumetric yield of the product can be increased by factor of 5 compared with conventional methods by controlling the time and amount of glucose (lactose) addition through which the oxygen partial pressure in the culture medium is maintained at least 10% (i.e. glucose limitation). The yield can further be improved by increasing the oxygen pressure using at least one of the means selected from the followings:

(a) fermentation under up to 2 bar overpress, (b) increasing the stirring rate and the aeration rate up to 2 vpm, and (c) lowering the temperature from 37 to 30 degree C. The advantage of this method is that it does not require particular equipment for aeration of highly pure oxygen and prevention of explosion of the oxygen.

発酵させる請求項1、2、3又は4記載の方法。

【請求項6】 cDNAがPP4、PP4-x又はPP4の突然変異体及び変異体をコードする請求項5記載の方法

【発明の詳細な説明】

本発明は、lacプロモーター又は改良 lacプロモーター（例えばlac、trc）を使用して大腸菌中外来性タンパクを製造するための最適化発酵法を記述する。炭素源としてグルコースを用いる初期増殖相の後、（1）グルコース制限下IPTGによるか又は（2）ラクトースによるか又は（3）ラクトース制限下IPTG及びラクトースにより生

10

成物形成の誘導が行われる。グルコース又はラクトースの制限は、酸素分圧が10%を超えて保たれるようにする。

大腸菌中多種の遺伝子組替タンパクを商業的な量製造することは原理的に周知である。これらのタンパクの発現は、適当な配剤をもつマルチコピイプラスミド中にコードするcDNAをクローニングすることによって可能となる。

このことについての発現実験は、普通培養プラスミド中実施される。この場合遺伝子組替タンパクの収量は、100ml未満の容量をもつ培養プラスミド中で培養が用いられ

20

るとき普通50〜100mg/lである。これらの技術を用いて遺伝子組替タンパクの製造に成功することは可能であるが、タンパク濃度及び製造可能な量を明らかに増大させる技術の必要性がある。これらの要件に適する1つの試みが発酵法の開発である。従って本発明の目的は、大腸菌中外来性タンパクの発現のための発酵法の最適化である。

必要性が、なとも部分的には満足されているいくつかのこのような方法が文献に記載されている。これらの場合には、プロモーターを使用することは、通常は、末端γ-ラクトンタンパク（γ-Gal）をもつ融合タンパクが製造されたことを意味している。この発酵における収量は普通リットルあたり融合タンパク0.1〜1.0gである。融合型γ-Galタンパクを考えるとときには、実際の生成物濃度は、該値の30%に低下することが多い。更に、生成物からγ-Galタンパクを除去するため綿密な精製処理を要する。

30

本発明は、ないしは、成熟した生成物の発現、即ち後に再び除去しない必要のない融合生成物のない生成物の発現を記述する。このような方法によって生成物の精製が比較的単純に行われる。しかし、発酵プラスミド生成物の特長及び容量収量（specific and volumetric yield）は普通かなり低い。この方法の生成物が革新的かつ生物学的に完全に活性な形態で製造されると、このことが特に当てはまる。革新的でありかつ宿主として用いられるタンパクの生成と異なり、革新的な生物学的に活性な生成物は、細胞が代謝で死亡し、通常、大腸菌培養の目的を失うこととなる。従って、大腸菌プラスミドによってかなり容易に分解されることとなる。これらの問題は、十分な宿主の炭素源としてグルコースが用い

40

50

られ、イソプロピルチオガラクトシド（IPTG）が誘導のために使用された今日までの方法において生物学的に完全に活性な生成物の200mg/lの収量を得ることが可能であった。

発酵を最適化するため、本発明は増殖率及び生成物形成の改善を課題とした。生成物は細胞の内部に形成されるので、生成物の比濃度（specific product concentration）（細胞あたり生成物の量）及び細胞数が重要である。この2つの因子の積がリットルあたりグラム（g/l）の方法の容量生産法である。

高細胞密度発酵は、遺伝子組替大腸菌株についてしばしば文献に記載されている。リットル（l）あたり乾燥物（DM）30gまでの細胞密度がこれに関連して述べられている。原理的に知られているいくつかの手段の組合せにより、遺伝子組替大腸菌K12株を150g/lに相当する50g/DM/lの細胞密度まで発酵させる方法を開発することが可能となっている。本発明において本質的なのは、取り入れ空気の酸素強化が後述される方法の1条件ではないことである。基質としての純酸素は高いコストを生じ、その上、爆発防止手段を有することが可能であるので、このことは方法の経済性に有利な効果を有する。

高い用量生成物収量をもつ方法について重要な因子は、プロモーターの最適誘導である。IPTGによる誘導は、前述した低細胞密度の場合に実施されており、文献に多数記載されている。IPTG（1mM〜10mM、好ましくは5mM）による誘導及び酸素分圧が10%より大きい、又はそれに等しくなるような基質としてグルコース制限の後、収量は0.2g/lから1.0g/lまでの容量収量の改善が達成されることが見出された。

本発明の第2の実施態様は、酸素供給と同時に突然インデュサーとしてラクトースを用いる増殖相場合の生成物形成の誘導よりなる。酸素分圧は、ラクトースの添加をコントロールすることによって上と同様に10%より大きい、又はそれに等しい水準に保たれた。ラクトースによる誘導は、この条件下でIPTG誘導より効率が低いといわれているので、文献において最適に至らないと見なされている。現在まで、ラクトースをインデュサーとして用いる効果のよい発酵法は記載されていない。本発明による実験的試みは、おおい生成物の形成の方が大腸菌の固有の代謝に対して小さい妨害効果を有しているの

スによる誘導を更にIPTG添加によって助けることが可能であった。この追加のIPTG誘導は、特定の選ばれた発酵装置の人力が培養物に酸素を供給するのに不十分であるときにのみ必要である。上述した第2の方法においてプラスミド損失の増大が観察されるので、スケールアップの際には発酵容量が増大するに従って変化する点があり、ラクトースによる誘導の際プラスミド損失のわずかな増大が観察されるので、その後最初は第2、次に第1の方法の方が経済的である。

生成物の濃度が最大になる時点で発酵を停止する。当業者に知られている処理を使用して生物体を濃縮（例えば分離器中）、崩壊（例えば高圧ホモジナイザー中）させる。細胞プラスミドの沈降の後では、生成物の大部分は透明になった上清中に含まれている。

従って、本発明は、*lac*プロモーター又は最適化*lac*プロモーター/コントロール下大腸菌中外来性遺伝子の発現のための最適化発酵法であって、

(1) IPTG、同時に基質制限されたグルコース添加、そしてグルコース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによるか、

(2) 又は炭素源及び同時に天然インジューサーとしてラクトース、ラクトース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによるか、

(3) 又は炭素源及び同時に天然インジューサーとしてラクトース、そして更にIPTG、ラクトース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによる対数増殖期の終末において誘導が行われる方法に関する。

この方法の好ましい変法においては、各々の場合酸素分圧を次の手段のうち1つ又はそれ以上によって増大さ

せる：

(a) 好ましくは2バールまでの、超大気圧下の発酵
(b) 入力（攪拌速度を増大させること）及び通気速度（2vvmまでの）のコントロールされた追跡

(c) Henry係数の改善及び代謝活性の低下により、酸素移行速度を増大させかつ酸素取込み速度を低下させる（バッチの大きさ（＝容器）が増大すると共に比入力（specific powerinput）が減少するので1,000ℓを超えるスケールアップの際必要）ために温度を37℃から30℃に至るまで低下させること。

炭素源として糖基質の添加が最大値5～10g/ℓにコントロールされること及び全発酵期間pHがpH6.7～pH7.3の範囲にNH₄OH及びH₃PO₄の添加によってコントロールされることは、この方法の変法のすべてに共通である。

上述した方法は、メンバクPP4及びPP4-x（これらはリボソームに属する（Grundmannら、Proc.Natl.Acad.Sci. 85（1988）3708～3712））、ならびにそれらの突然変異体（mutant）及び変異体（variant）の遺伝子工学的製造に好ましく用いられる。

本発明は、実施例及び特許請求の範囲において更に説明されている。

実施例

次の実施例は大腸菌K12株W3110 *lac* 10（Brent及びP. ashne（1981）Proc. Acad. Natl. Sci. USA 78, 4204～4208）の発酵を記述するもので、この菌株は、プラスミドpTc99A-PP4（Amannら（1988）Gene 69, 301～315）又はpTc99A-PP4-x（Grundmannら（1988）Behring Inst. Mitt. 22, 59～67）を用いて形質変換されている。

表1は極大で過している培地を示す。

表 1

生育培地の1例の組成

(リットルあたりg又はmg単位のデータ)

炭素源(糖)必要に応じ

イーストエキス	20g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1.2g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.5g
KCl	1.0g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.0g
クエン酸	0.25g
NH_4Cl	5.0g
チアミン	5.0mg
H_3BO_3	2.0mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.8mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.16mg
KI	0.4mg
$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.02mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.6mg

発酵は8ℓの発酵容量をもつ10ℓのBostat Eファーマンター(製作者: Braun Messungen)中実施された。

発酵の間プラスミド含有細胞に対して選択圧力はかけなかった。即ち発酵は抗生物質の添加なしに実施された。ファーマンターは一夜の振盪フラコ前培養物を接種した。増殖の初期相において炭素源としてグルコースを用い、この相において0.1M未満の酢酸が生成するようにグルコースをはかり入れた。酢酸濃度が増大すると生成物の収量は有意に低下した。増殖の初期相中10~15時間後、約500g/lの細胞濃度が達成され、生成物形成の誘導は次の3つの異なる別的方式で行われた。

(1) 1~10mMのPTG(好ましくは5mMのPTG)の添加後グルコースのはかり入れを継続

増殖の初期相の終末において、炭素源としてグルコー

40

ス(「基質」)のはかり入れを継続しながら1~10mMのPTG(好ましくは5mMのPTG)を添加することによって生成物の形成を誘導した。この場合生成物形成の速度は、その時におけるグルコース濃度への明らかな依存性を示した。実際の基質としてグルコース及び外見上の基質としてPTGは競合する基質と思われ、シメーレーの法則に従って、グルコースは30g/lの活性化を部分的又は完全に抑制した。この場合1g/lのPP4又は2PP4xの収量がグルコース制限系(0.1g/l未満のグルコース濃度)において得られた。

グルコースの制限は、ポンプを設置することによるか又はオンラインHPLC測定を用いて実施された。細胞の増殖速度は、非制限系中誘導によって低下しなかったが、予想されたとおりに制限系中グルコース濃度の関数と

50